

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013473846

WPI Acc No: 2000-645789/200062

XRAM Acc No: C00-195130

Biopreparation preparing using industrial strain of Bacillus subtilis
Patent Assignee: GAPONYUK P YA (GAPO-I); MARKOV I A (MARK-I); MARKOVA E A (MARK-I); MIKHAILOVA N A (MIKH-I)

Inventor: GAPONYUK P YA; MARKOV I A; MARKOVA E A; MIKHAILOVA N A

Number of Countries: .001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
RU 2149008	C1	20000520	RU 99121289	A	19991013	200062 B

Priority Applications (No Type Date): RU 99121289 A 19991013

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
RU 2149008	C1		A61K-035/74	

Abstract (Basic): RU 2149008 C1

NOVELTY - Industrial strain of Bacillus subtilis is cultured in nutrient medium providing spore formation. Biomass is separated from nutrient medium, mixed with stabilizing agent based on sugar-gelatin medium and calcium glucanate taken in an amount 0.1-5.0 wt.% or with acetylphthalyl-cellulose. After mixing biomass with acetylphthalylcellulose obtained microgranules are separated, washed and dried.

DETAILED DESCRIPTION - Industrial strain of Bacillus subtilis is cultured in nutrient medium providing spore formation. Biomass is separated from nutrient medium, mixed with stabilizing agent based on sugar-gelatin medium and calcium glucanate taken in an amount 0.1-5.0 wt.% or with acetylphthalyl-cellulose. Biomass and stabilizing agent are taken at the ratio=(1:1)-(1:1.5). Obtained mixture is dried and placed into gelatin capsules. Nutrient medium has the following components, g/l: potassium dihydrogen phosphate, 0.2-0.4; ammonium sulfate, 1.0-3.0; sodium citrate, 1.0-3.0; copper sulfate, 0.001-0.01; zinc sulfate, 0.002-0.005; iron sulfate, 0.0001-0.001; calcium chloride, 0.09-0.2; magnesium sulfate, 0.1-0.5; manganese sulfate, 0.01-0.1; peptone, 2.0-8.0; maltose, 1.0-5.0; and water, the balance. After mixing biomass with acetylphthalylcellulose obtained microgranules are separated, washed out with physiological solution and drying is carried out without preliminary freezing. Obtained preparation shows enhanced antagonistic activity with respect to some microorganisms and enhanced adaptability of its bacteria in human gastroenteric tract. Invention can be used in production of curative-prophylactic preparations, in part, probiotics based on bacteria of genus Bacillus.

USE - Biotechnology, microbiology.

ADVANTAGE - Improved method of biopreparation preparing.

pp; 0 DwgNo 0/0

Title Terms: PREPARATION; INDUSTRIAL; STRAIN; BACILLUS; SUBTILIS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-035/74

International Patent Class (Additional): C12N-001/04; C12N-001/20;

C12R-001-125

File Segment: CPI



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 149 008** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 K 35/74, C 12 N 1/20,**
1/04/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:125)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99121289/13, 13.10.1999

(24) Дата начала действия патента: 13.10.1999

(46) Дата публикации: 20.05.2000

(56) Ссылки: RU 2130316 C, 20.05.99. RU 2067616 C, 10.10.96. RU 2058681 C, 20.04.96. RU 2076722 C1, 10.04.97. RU 2105562 C, 27.02.98. RU 2056855 C, 27.03.96. RU 1835845 C, 09.02.94. EP 0287699 A, 26.10.88. WO 89/09607 A, 19.10.89.

(98) Адрес для переписки:
103030, Москва, пл. Борьбы 15/1, АО
"ФИРН-М", генеральному директору Маркову
И.А.

(71) Заявитель:

Михайлова Наталья Александровна,
Гапонюк Петр Яковлевич,
Маркова Елена Алексеевна,
Марков Илья Александрович

(72) Изобретатель: Михайлова Н.А.,

Гапонюк П.Я., Маркова Е.А., Марков И.А.

(73) Патентообладатель:

Михайлова Наталья Александровна,
Гапонюк Петр Яковлевич,
Маркова Елена Алексеевна,
Марков Илья Александрович

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии и может быть использовано в производстве лечебно-профилактических препаратов, в частности пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*. Производственный штамм *Bacillus subtilis* культивируют на питательной среде, обеспечивающей спорообразование. Отделяют биомассу от питательной среды. Смешивают ее со стабилизатором на основе сахарожелатиновой среды и глюконата кальция, взятым в количестве 0,1-5,0 мас.%, или ацетилфталилцеллюлозы. Причем биомассу и стабилизатор берут в соотношении 1:1-1:1,5. Полученную смесь высушивают и заключают в желатиновые капсулы. Питательная среда содержит, г/л: фосфат калия однозамещенный - 0,2-0,4;

сульфат аммония - 1,0-3,0; цитрат натрия - 1,0-3,0; сернокислая медь - 0,001-0,01; сернокислый цинк - 0,002-0,005; сернокислое железо - 0,0001-0,001; хлористый кальций - 0,09-0,2; сернокислый магний - 0,1 - 0,5; сернокислый марганец - 0,01-0,1; пептон - 2,0-8,0; мальтоза - 1,0-5,0; вода - остальное. После смешивания биомассы с ацетилфталилцеллюлозой полученные микрогранулы отделяют, промывают физиологическим раствором, а высушивание проводят без предварительной заморозки. Полученный биопрепарат обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к некоторым микроорганизмам и характеризуется более высокой приживаемостью входящих в него бактерий в желудочно-кишечном тракте человека. 3 з.п.ф-лы.

RU 2 149 008 C1

RU 2 149 008 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 149 008** (13) **C1**
(51) Int. Cl. 7 **A 61 K 35/74, C 12 N 1/20,**
1/04/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:125)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99121289/13, 13.10.1999
(24) Effective date for property rights: 13.10.1999
(46) Date of publication: 20.05.2000
(98) Mail address:
103030, Moskva, pl. Bor'by 15/1, AO
"FIRN-M", general'nomu direktoru Markovu I.A.

(71) Applicant:
Mikhajlova Natal'ja Aleksandrovna,
Gaponjuk Petr Jakovlevich,
Markova Elena Alekseevna,
Markov Il'ja Aleksandrovich
(72) Inventor: Mikhajlova N.A.,
Gaponjuk P.Ja., Markova E.A., Markov I.A.
(73) Proprietor:
Mikhajlova Natal'ja Aleksandrovna,
Gaponjuk Petr Jakovlevich,
Markova Elena Alekseevna,
Markov Il'ja Aleksandrovich

(54) **METHOD OF BIOPREPARATION PREPARING**

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology, microbiology.
SUBSTANCE: industrial strain of *Bacillus subtilis* is cultured in nutrient medium providing spore formation. Biomass is separated from nutrient medium, mixed with stabilizing agent based on sugar-gelatin medium and calcium glucanate taken in the amount 0.1-5.0 wt.% or with acetylphthalyl-cellulose. Biomass and stabilizing agent are taken at the ratio = (1:1)-(1:1.5). Obtained mixture is dried and placed into gelatin capsules. Nutrient medium has the following components, g/l: potassium dihydrogen phosphate, 0.2-0.4; ammonium sulfate, 1.0-3.0; sodium citrate, 1.0-3.0; copper sulfate, 0.001-0.01; zinc sulfate, 0.002-0.005; iron sulfate,

0.0001-0.001; calcium chloride, 0.09-0.2; magnesium sulfate, 0.1-0.5; manganese sulfate, 0.01-0.1; peptone, 2.0-8.0; maltose, 1.0-5.0; and water, the balance. After mixing biomass with acetylphthalylcellulose obtained microgranules are separated, washed out with physiological solution and drying is carried out without preliminary freezing. Obtained preparation shows enhanced antagonistic activity with respect to some microorganisms and enhanced adaptability of its bacteria in human gastroenteric tract. Invention can be used in production of curative-prophylactic preparations, in part, probiotics based on bacteria of genus *Bacillus*. EFFECT: improved method of biopreparation preparing. 4 cl, 3 ex

RU 2 149 008 C1

RU 2 149 008 C1

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии и может быть использовано в производстве биопрепаратов, в частности пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*.

Пробиотические препараты из бактерий рода *Bacillus* широко используются в ветеринарии и медицине. Терапевтическая эффективность пробиотиков определяется адгезивными и антагонистическими свойствами бактерий-пробионтов и их способностью выживать и развиваться в кишечнике человека.

Известен антибиотикорезистентный штамм *Bacillus Subtilis* PAC KM-115, используемый для получения пробиотиков для лечения и профилактики инфекционных заболеваний при одновременной антибиотикотерапии (RU N 2115725 C, C 12 N 1/20, опубл. 20.07.98).

Однако известный штамм и, следовательно, препараты на его основе обладают недостаточно высокой адгезивной активностью к различным отделам желудочно-кишечного тракта, что снижает эффективность их лечебно-профилактического действия.

Известен способ получения биопрепарата "Бактиспорин" на основе штамма *Bacillus Subtilis* 3Н (ГИСК N 248), включающий культивирование штамма в синтетической питательной среде с мальтозой, отделение полученной культуры от питательной среды, промывание, концентрирование и лиофильное высушивание (RU N 2067616 C, C 12 N 1/20, опубл. 10.10.96).

Однако полученный таким образом препарат обладает рядом недостатков. Лиофильно высушенная биомасса гигроскопична, что затрудняет изготовление таблетированных препаратов, и нестабильна при остаточной влажности более 3,5%. Кроме того, полученный препарат недостаточно устойчив к ряду антибиотиков, применяемых при тяжелых формах гнойно-воспалительных заболеваний.

Наиболее близким аналогом является способ получения биопрепарата "Бактиспорин", предусматривающий получение биомассы штамма *Bacillus Subtilis* 3Н (ГИСК N 248) в воде или в физиологическом растворе, смешивание ее с наполнителем (защитной средой) - сахарожелатиновой смесью или лактозой, ампулирование и лиофильное высушивание (RU 3 2130316 C, A 61 K 35/74, опубл. 20.05.99 г.).

Недостатком ближайшего аналога является невозможность получения данным способом высокой концентрации живых микробных клеток в препарате. Лиофилизированный препарат во флаконах или ампулах требует перед применением разведения водой, что снижает удобство пользования препаратом. Кроме того, растворенная микробная масса не стабильна при хранении, подвержена губительному воздействию желудочного сока. Вследствие этого в тонкий и толстый отделы кишечника, являющиеся главным местом терапевтического воздействия пробиотиков, доходит значительно меньшее количество жизнеспособных бактерий.

Задачей изобретения является разработка технологического способа, позволяющего получить высоко эффективный пробиотик - в

удобной для потребителя капсулированной форме, устойчивой к негативному воздействию кислой среды желудка и легко растворимой в кишечнике. Технический результат изобретения заключается в повышении терапевтической эффективности пробиотического препарата за счет увеличения количества жизнеспособных клеток и повышения их сохранности в процессе изготовления и применения препарата, повышения его адгезивной и антагонистической активностей.

Для достижения указанного технического результата в способе получения биопрепарата на основе *Bacillus Subtilis* согласно изобретению производственный штамм *Bacillus Subtilis* культивируют на питательной среде, обеспечивающей спорообразование, отделяют биомассу от питательной среды, смешивают ее со стабилизатором на основе сахарожелатиновой среды и глюконата кальция, взятым в количестве 0,1 - 5,0 мас.%, или ацетилфталилцеллюлозы, причем биомассу и стабилизатор берут в соотношении 1:1-1:1,5, полученную смесь высушивают и заключают в желатиновые капсулы.

Питательная среда содержит, г/л: фосфат калия однозамещенный - 0,2 - 0,4; сульфат аммония - 1,0-3,0; цитрат натрия - 1,0-3,0; сернокислая медь - 0,001-0,01; сернокислый цинк - 0,002 - 0,005; сернокислое железо - 0,0001 - 0,001; хлористый кальций - 0,09-0,2; сернокислый магний - 0,1-0,5; сернокислый марганец - 0,01 - 0,1; пептон - 2,0 - 8,0; мальтоза - 1,0-5,0; вода - остальное.

Причем после смешивания биомассы с ацетилфталилцеллюлозой полученные микрогранулы отделяют. Промывают физиологическим раствором, а высушивание проводят без предварительной заморозки. Полученный биопрепарат дополнительно содержит споры *Bacillus Subtilis*.

Использование сбалансированной питательной среды позволяет уже на этапе культивирования получать высокий выход микробных клеток, не требует проведения дополнительных этапов концентрирования биомассы. Кроме того, состав питательной среды, на которой выращивались бактерии, положительно влияет на их выживаемость в процессе лиофилизации и хранения. Увеличивает устойчивость к неблагоприятным факторам.

Введение в качестве компонента защитной среды глюконата кальция в количестве 0,1-5,0 мас.% обеспечивает сохранность структур микробной клетки не менее 93% и значительно уменьшает потери биомассы при приготовлении и использовании целевого продукта.

Микрогранулирование биомассы обработкой ацетилцеллюлозой также повышает сохранность жизнеспособных клеток как при изготовлении, так и использовании лечебно-профилактического препарата.

В результате изобретения получают капсулированный стабильный ацидорезистентный препарат, удобный для потребителя.

Биопрепарат обладает более высокой антагонистической активностью по отношению к некоторым микроорганизмам и

характеризуется более высокой приживаемостью входящих в него бактерий в желудочно-кишечном тракте человека. Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Bacillus Subtilis* 3Н (ГИСК N 248) культивируют на среде следующего состава, г/л: фосфат калия однозамещенный - 0,2; сульфат аммония - 1,0; цитрат натрия - 1,0; сернокислая медь - 0,001; сернокислый цинк - 0,002; сернокислое железо - 0,0001; хлористый кальций - 0,09; сернокислый магний - 0,1; сернокислый марганец - 0,01; пептон - 2,0; мальтоза - 1,0; вода - до 1 л.

За время культивирования в течение 16 + 2 ч достигается выход биомассы преимущественно в споровой форме в титре, что выше в среднем на 40% по сравнению со стандартной средой. Полученную культуру отделяют от питательной среды с продуктами метаболизма, добавляя стабилизатор на основе сахарожелатиновой среды и глюконата кальция, взятого в количестве 0,1 или 5,0 мас.%. Причем биомассу и стабилизатор берут в соотношении 1:1,5 и высушивают смесь лиофильным способом по общепринятой технологии. По окончании сушки биомассу измельчают до получения однородной массы и при необходимости смешивают с известным наполнителем. Далее лиофилизированную массу помещают в разъемные желатиновые капсулы. Готовые капсулы с содержанием $1 \cdot 10^9 - 10^{10}$ микробных клеток в одной дозе контролируют в соответствии с предъявляемым к ним требованиям и упаковывают в герметичную тару.

Пример 2. Получают биомассу штамма *Bacillus Subtilis* 534 (ВКМ NB-1666Д) аналогично примеру 1. Штамм культивируют на среде следующего состава, г/л: фосфат калия однозамещенный - 0,4; сульфат аммония - 3,0; цитрат натрия - 3,0; сернокислая медь - 0,01; сернокислый цинк - 0,005; сернокислое железо - 0,001; хлористый кальций - 0,2; сернокислый магний - 0,5; сернокислый марганец - 0,1; пептон - 8,0; мальтоза - 5,0; вода - до 1 л.

К 250 мл полученной микробной суспензии доливают 250 мл 10% раствора ацетилфталилцеллюлозы в ацетоне (1:1) при непрерывном перемешивании (на гомогенизаторе) с максимальной скоростью вращения ножей. Затем скорость перемешивания уменьшают. Перемешивание ее проводят до полного удаления ацетона. Полученные таким образом микрогранулы отфильтровывают, промывают физиологическим раствором, отжимают и сушат. Сушку производят при комнатной температуре 7 сут. Остаточная влажность составляет 15%. Досушивание гранул производят в установке "Иней" под вакуумом без предварительной заморозки. Процесс досушивания производят в течение 5 ч при давлении 20 Па. Остаточная влажность составляет 8-12%.

Далее гранулы расфасовывают в желатиновые капсулы и контролируют в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Пять серий полученного биопрепарата отконтролированы в ГИСК им. Тарасовича через два года после изготовления. Все

показатели качества остались неизменными.

Пример 3. Полученный по примеру 1 или 2 препарат используют для лечения коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта на фоне применения антибиотиков.

Больной Петров И.К., 1989 года рождения, находился на стационарном лечении с диагнозом пневмония. Сопутствующие заболевания: дисбактериоз кишечника ассоциированный, субкомпенсированная форма. В связи с основным заболеванием получил курс антибиотикотерапии, на фоне которого у больного появился диспептический синдром: боли в животе, ощущение тошноты, отсутствие аппетита, расстройство стула. Больному назначен биопрепарат по 1 капсуле 3 раза в день в течение 10 дней. К третьему дню приема препарата общее состояние больного нормализовалось, исчезли явления диспепсии, стул стал переваренным.

Больная Онищенко О. В., 1990 года рождения, находилась на стационарном лечении с диагнозом острая ангина. Сопутствующие заболевания: ассоциированный дисбактериоз субкомпенсированная форма, атопический дерматит, пищевая аллергия. В анамнезе у ребенка наблюдались явления дисбактериоза кишечника с трехлетнего возраста. Последнее обострение дисбактериоза вызвано основным заболеванием и приемом антибиотиков, биопрепарат введен в курс лечения по 1 капсуле (одна доза) 2 раза в день в течение 10 дней. Со второго дня приема препарата уменьшилась болезненность при пальпации кишечника, отмечено субъективное улучшение общего состояния, появился аппетит. С третьего дня стул принял переваренную консистенцию.

Формула изобретения:

1. Способ получения биопрепарата на основе *Bacillus subtilis*, отличающийся тем, что производственный штамм *Bacillus subtilis* культивируют на питательной среде, обеспечивающей спорообразование, отделяют биомассу от питательной среды, смешивают его со стабилизатором на основе сахаро-желатиновой среды и глюконата кальция, взятым в количестве 0,1 - 5,0 мас.%, или ацетилфталилцеллюлозы, причем биомассу и стабилизатор берут в соотношении 1 : 1 - 1 : 1,5, полученную смесь высушивают и заключают в желатиновые капсулы.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что питательная среда содержит, г/л:

Фосфат калия однозамещенный - 0,2 - 0,4
Сульфат аммония - 1,0 - 3,0
Цитрат натрия - 1,0 - 3,0
Сернокислая медь - 0,001 - 0,01
Сернокислый цинк - 0,002 - 0,005
Сернокислое железо - 0,0001 - 0,001
Хлористый кальций - 0,09 - 0,2
Сернокислый магний - 0,1 - 0,5
Сернокислый марганец - 0,01 - 0,1
Пептон - 2,0 - 8,0
Мальтоза - 1,0 - 5,0
Вода - Остальное

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что после смешивания биомассы с ацетилфталилцеллюлозой полученные микрогранулы отделяют, промывают физиологическим раствором, а высушивание проводят без предварительной заморозки.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что

полученный биопрепарат дополнительно содержит споры *Bacillus subtilis*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2149008 C1

RU 2149008 C1